

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-38064

(43) 公開日 平成8年(1996)2月13日

(51) Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 2 3 K 1/16	3 0 3 D	8502-2B		
	3 0 4 B	8502-2B		
1/00	1 0 1	8502-2B		

審査請求 未請求 請求項の数 3 F D (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願平6-192717

(22) 出願日 平成6年(1994)7月26日

(71) 出願人 000006091

明治製菓株式会社

東京都中央区京橋2丁目4番16号

(72) 発明者 中村 博文

埼玉県坂戸市千代田5丁目3番1号 明治  
製菓株式会社生物科学研究所内

(72) 発明者 清水 裕子

埼玉県坂戸市千代田5丁目3番1号 明治  
製菓株式会社生物科学研究所内

(72) 発明者 清水 功雄

神奈川県横浜市港北区師岡町760番地 明  
治製菓株式会社薬品総合研究所内

(74) 代理人 弁理士 湯本 宏

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 有害細菌の感染を予防する飼料

(57) 【要約】

【目的】 本発明は、腸管を経由して起こる有害細菌の感染を予防する飼料を提供することを目的とする。

【構成】 マンノース類、シアル酸類およびラクト-N-フコペンタオースから選ばれる1種以上を有害細菌の感染予防成分として配合することを特徴とする飼料。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 マンノース類、シアル酸類およびラクト-N-フコペンタオースから選ばれる1種以上を有害細菌の感染予防成分として配合することを特徴とする飼料。

【請求項2】 マンノース類がマンノース；メチル- $\alpha$ -マンノシド；マンノオリゴ糖；またはグアーガム、ローカストビーンガムまたは酵母から得られるマンナン、の酵素および/または酸による加水分解物である請求項1記載の飼料。

【請求項3】 シアル酸類がN-アセチルノイラミン酸、N-アセチルノイラミン酸結合オリゴ糖、N-アセチルノイラミン酸結合ペプチド、N-アセチルノイラミン酸結合タンパク質またはガングリオシドである請求項1記載の飼料。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は有害細菌の感染を予防する飼料に関し、更に詳しくは、腸管を経由して感染する有害細菌の感染予防を目的とする飼料に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 これまで動物特に家畜家禽の飼料において、飼育効率の増大、増体効果などの成長促進、細菌性下痢の予防等を目的として、抗生物質が広く使用されてきており、その効果も認められている。しかし、その抗生物質が食肉や卵に移行し残留する点が問題となっている。さらに、抗生物質の慢性的使用は、耐性菌の出現を引き起こしたり、家畜の腸内細菌叢を乱し、感染に対する家畜の抵抗性を低下させることが懸念されている。そのため、昭和51年5月「飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律」が施行されて、抗生物質等の飼料への添加は厳しく規制されるようになった。

【0003】 このような状況の中で、抗生物質等に代わって上記目的を達成する物質が注目され、このような物質として生菌製剤（プロバイオティクス）が開発された。すなわち、動物の腸内に棲息する有用細菌を製剤化して動物に与え、動物の腸内細菌叢を改善する試みがなされてきた。このような生菌製剤としては、乳酸桿菌（ラクトバチルス属細菌）や乳酸球菌（例えばストレプトコッカス・フェカリス）が最もよく使用されてきたが、近年ではバチルス属菌、ビフィズス菌または酪酸菌（例えばクロストリジウム・ブチリカム）などを有効成分とする生菌製剤が市販されている。

【0004】 しかし、生菌製剤として利用される有用菌は、抗生物質に対する感受性が高く、抗生物質と併用すると、腸内で増殖・定着できないものが多い。また、有用腸内菌であっても、他の動物種の腸内には定着できないものも多く、たとえ動物種固有の菌であっても、体外から給与すると、排除される傾向が強い。また、製剤における有用菌の生存率の低さに伴う有効性の低下・変動といった製剤の安定化の課題も残されている。

【0005】 そこで近年、微生物の感染を制御できる安全性の高い天然糖質等の探索が行われてきており、このような物質としては大腸菌等の感染を予防するマンノグルカン誘導体（特開昭61-40219）やグリコペプチド組成物（特開昭61-103829）およびシアル酸類（特開昭62-208261）が知られている。しかし、マンノグルカン誘導体は白血球の増加あるいは機能亢進を主作用とし、間接的に感染症の発症を抑制するため、抗生物質との併用は避けられない。

【0006】 グリコペプチド組成物は、I型線毛を有する病原菌（大腸菌、サルモネラ・ティフィムリウム、クレブシエラ・ニューモニエ、シゲラ・フレクスネリ等）のみが対象である。シアル酸類はヒトの下痢の原因となる病原性大腸菌を対象としている。このような感染防御剤は、対象とする有害細菌と宿主の組み合わせが限定されるものであり、動物の消化管内を経由して感染する有害細菌については、サルモネラ菌の増殖阻止に関するフラクトオリゴ糖（特表平3-501971）、およびブロイラーへのサルモネラ菌の定着を予防するD-マンノース（B.A.Oyofu et al; Poultry Science 68: 1357-1360、1989年）等が報告されているのみで、各種の有害細菌感染予防効果をもつ物質が要望されている。

【0007】 他方、宿主細胞に対する細菌やウイルスの付着現象は感染症の端緒として注目されている。すなわち、感染が起こるためには、まず、細菌やウイルスが宿主の感染部位に付着しなければならない。付着能をもたないものは、生体のもつ防御能力や自浄作用によって感染部位から排除されてしまう。このような付着現象には、糖質が関与していることが明らかになりつつある

（C.S.Eden; Current topics in infectious disease No.3、1989年）。すなわち、細菌の中にはその表面にレクチン（アドヘシン）をもつものが存在し、細菌はこのアドヘシンを用いて、標的細胞表面に存在する相補的な糖受容体へ結合すると考えられている。

【0008】 上皮細胞受容体の特異性は、細胞表層の糖組成によるもので、タンパク質や脂質と結合して糖タンパク質または糖脂質の形で存在する。これら細胞表層の糖組成は種、個体のみならず、同一個体の組織間でも大きな差異がみられる。このような糖組成の差異が、それぞれの標的組織に対する細菌の結合性の差異、つまり、細菌が感染する宿主・感染部位を規定していると考えられる。このように、宿主に対する細菌の付着現象は、糖を介した細胞認識系のモデルとして理解されている。細菌のレクチンと宿主細胞表層の糖鎖に関する研究が進んでおり、また細菌の付着を特異的に阻害する糖などを、細菌感染症の予防に利用する研究も行われている。このような細菌の付着現象を制御する糖質の開発、およびそのような糖質を用いた有害細菌の感染を制御する方法の開発が期待されている。

## 【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、細菌の宿主細胞への付着を阻害する物質を有効成分とし、有害細菌感染を予防する飼料を提供することを課題とする。

## 【0010】

【課題を解決するための手段】本発明によれば、有害細菌の腸管上皮細胞への付着を阻害することにより、有害細菌が家畜家禽の腸管へ定着するのを予防する物質を有効成分として含有する飼料が提供される。以下、本発明をさらに詳細に説明する。本発明において、感染予防成分として配合させる糖質の有効性は、健康人由来大腸菌、鶏病原性大腸菌、キャンピロバクター・ジェジュニ等の細菌を用いて、ヒト腸管上皮細胞Intestine 407へのin vitro付着阻害試験およびブロイラーへの感染試験を行うことにより評価した。

【0011】その結果、マンノース；メチル- $\alpha$ -マンノシド；マンノオリゴ糖；またはグアーガム、ローカストビーンガムまたは酵母から得られるマンナンの酵素および／または酸による加水分解物であるマンノース類、およびN-アセチルノイラミン酸、N-アセチルノイラミン酸結合オリゴ糖、N-アセチルノイラミン酸結合ペプチド、N-アセチルノイラミン酸結合タンパク質、ガングリオシドであるシアル酸類、およびラクト-N-フコペンタオースが有効であることを発見し、本発明を完成させるに至った。

【0012】本発明に用いられるマンノース類は、マンノースを含有する原料を酵素および／または酸による加水分解を含む方法で調製した混合物でもよく、またはそれらの分画品や市販品も使用可能である。具体的に例を挙げると、例えばマンノース類は、グアーガムを原料とする低粘度ガラクトマンナン（商品名「グアファイバー」、明治製菓（株）製）や乳糖（商品名「プロティベル」、ベル・インダストリーズ製）より得られる多糖画分を、硫酸等による酸加水分解又はマンナナーゼ等による酵素加水分解をすることにより得ることができる。

【0013】また、N-アセチルノイラミン酸結合タンパク質、N-アセチルノイラミン酸結合ペプチド、シアルラクトース等のN-アセチルノイラミン酸結合オリゴ糖、N-アセチルノイラミン酸、ガングリオシド等のシアル酸類も、市販品に加え公知の方法により牛乳や鶏卵等から調製することができる。また、ラクト-N-フコペンタオースは、市販品に加え、人乳等から公知の方法で調製することができる。

【0014】このようにして得られたマンノース類またはシアル酸類またはラクト-N-フコペンタオースは、それ自体またはその濃縮物または賦形剤等の添加物を加えて、飼料に0.05%～5.0%好ましくは0.1～1.0%添加するのが適当である。また、これらマンノース類またはシアル酸類またはラクト-N-フコペンタオース

\*ースは、飲水に添加してもさしつかえない。賦形剤は特に限定されず、乳糖、炭酸カルシウム、脱脂粉乳、コーングリッツ等を用いることができる。

【0015】本発明の飼料を摂取させる家畜家禽は特に限定されない。例えば、牛、豚、鶏、馬、羊、七面鳥、ウズラ等に限らず、イヌやネコ等のペット、動物園等の観賞用の動物、マウス、ラット、ウサギ、モルモット等の実験動物にも適用できる。投与方法は、粉末とした場合には、飼料に混合して、液体の場合は飲水に混合して投与することができる。投与時期は特に限定されないが、一般の抗菌剤とは異なるので、腸内有害細菌の菌数が少ない雛あるいは幼畜等の時期から投与を始めるのが好ましい。

【0016】本発明の飼料は、例えば鶏の場合、食中毒を引き起こす恐れのあるサルモネラ属細菌、病原性大腸菌、キャンピロバクター属細菌、クロストリジウム・パーフリンゲンス等の腸管への付着を阻害することにより、感染を予防することができる。

## 【0017】

【実施例】次に本発明の実施例を示す。

## 実施例1（大腸菌付着阻害試験）

ヒト腸管上皮細胞 Intestine 407 を10%ウシ胎児血清を添加した 最少イーグル培地（以下、MEM培地と表記する）で37℃、24時間、CO<sub>2</sub>インキュベータ内で培養して単層を形成させ、MEM培地で洗浄して血清成分を除去した。Luria-Bertani brothで37℃、18時間培養した健康人由来大腸菌または鶏病原性大腸菌を、集菌後、PBS(-)（リン酸緩衝生理食塩水、CaとMgを含まず）で洗浄し、10<sup>8</sup>/mlになるように供試糖質を溶解したMEM培地に懸濁した。10分後にこの大腸菌懸濁液を上記Intestine 407に添加した。37℃で90分間CO<sub>2</sub>インキュベータ内でインキュベートした後、MEM培地で3回洗浄して非付着菌を除去してから走査型電子顕微鏡を用いて Intestine 407 に付着している菌数を細胞30個について計数し、平均付着菌数を算出した。対照区における平均付着菌数をB0、試験区における平均付着菌数をBとし、付着率Aを下記により算出した。

$$【0018】 A = B / B0 \times 100 (\%)$$

各種糖質について大腸菌付着阻害試験を行い、有効な糖質を評価した結果を表1および表2に示す。表1より明らかなように、健康人由来大腸菌については、シアル酸類、ラクト-N-フコペンタオースに大腸菌付着阻害効果が認められた。また、表2から明らかなように、鶏病原性大腸菌についてはマンノース類、シアル酸類、ラクト-N-フコペンタオースに大腸菌付着阻害効果が認められた。

## 【0019】

【表1】

健康人由来大腸菌の付着阻害試験

供試試料 (添加量)	付着率 (%)
コントロール (無添加)	100
ラクト-N-フコペンタオース I <sup>1)</sup> (0.05%)	55*
G <sub>M1</sub> -ベンタサッカライド <sup>2)</sup> (0.1%)	58*
N-アセチルノイラミン酸 (0.1%)	78*
G <sub>M1</sub> <sup>3)</sup> (0.1%)	13*
G <sub>M2</sub> <sup>4)</sup> (0.1%)	11*
G <sub>M3</sub> <sup>5)</sup> (0.1%)	34*
フェチュイン <sup>6)</sup> (0.1%)	61*

\*t 検定で有意差あり (p<0.01)

1) ラクト-N-フコペンタオース I ;

Fuc α1→2Gal β1→3GlcNAc β1→3Gal β1→4Glc

2) G<sub>M1</sub>-ベンタサッカライド ;

Gal β1→3GalNAc β1→4(NeuAc α2→3)Gal β1→4Glc

G<sub>M1</sub>の糖鎖 (オリゴ糖部分)

3) G<sub>M1</sub> ; Gal β1→3GalNAc β1→4(NeuAc α2→3)Gal β1→4Glc β1→1' Cer

4) G<sub>M2</sub> ; GalNAc β1→4(NeuAc α2→3)Gal β1→4Glc β1→1' Cer

5) G<sub>M3</sub> ; NeuAc α2→3 Gal β1→4Glc β1→1' Cer

6) N-アセチルノイラミン酸結合タンパク質

\* 20 \* 【表2】

【0020】

#### 鶏病原性大腸菌の付着阻害試験

供試試料 (添加量)	付着率 (%)
コントロール (無添加)	100
ラクト-N-フコペンタオース I <sup>1)</sup> (0.5%)	47*
Man <sup>2)</sup> (0.1%)	49*
α Man→OMe <sup>3)</sup> (0.05%)	71*
α Man→OMe (0.1%)	37*
α Man1→2 α Man-1→OMe (0.1%)	64*
α Man1→3 α Man-1→OMe (0.1%)	75*
α Man1→4 α Man-1→OMe (0.1%)	57*
ガングリオシド混合物 (0.5%)	14*

\*t 検定で有意差あり (p<0.01)

1) ラクト-N-フコペンタオース I ;

Fuc α1→2Gal β1→3GlcNAc β1→3Gal β1→4Glc

2) Man ; マンノース

3) α Man→OMe ; メチル-α-マンノシド

【0021】 実施例2 (キャンピロバクター・ジェジュニ付着阻害試験)

実施例1と同様の方法でヒト腸管上皮細胞 Intestine 407を単層培養し、MEM培地で洗浄して血清成分を除去した。Brucella brothで37℃、18時間培養したキャンピロバクター・ジェジュニを、集菌後 PBS(-)で洗浄し、10<sup>8</sup>/mlになるように供試糖質を溶解した MEM培地に懸濁した。10分後にキャンピロバクター・ジ

※ジェジュニ懸濁液を上記 Intestine 407 に添加した。

37℃で90分間 CO2インキュベーター内でインキュベートした後、実施例1と同様の方法で付着率を算出した。

キャンピロバクター・ジェジュニ付着阻害試験を各種糖質について行い、有効な糖質を検索した結果、有効であった糖質を表3に示す。

【0022】

【表3】

#### キャンピロバクター・ジェジュニの付着阻害試験

供試試料 (添加量)	付着率 (%)
コントロール (無添加)	100
Man (50 mM)	56*
α Man→OMe (50 mM)	75*
グアファイバー** (1.0%)	14*

\*t 検定で有意差あり ( $p < 0.01$ )

\*\*低粘度ガラクトマンナン (明治製菓(株)製)

【0023】実施例3 (大腸菌感染試験)

グアファイバー12kgを水道水77.8リットルに溶解させ、濃硫酸2.2リットルを加えた。この溶液を95度に加熱し、5時間反応させた。反応液を水酸化ナトリウムでpH7.0に中和した後、ミリポア社の連続脱塩システム(CDI)により脱塩し、B×34.5のグアファイバー分解物とした。

【0024】一方、プロチベル20kgを水道水85リットルに懸濁させ、40%水酸化ナトリウム15リットルを加えた。この懸濁液を93℃に加温し、8時間反応させた後、濃塩酸でpH7.5に中和し、固液分離した。得られた反応液60リットルを限外濾過し、分子量1万以上の画分を回収し、ミリポア社の連続脱塩システム(CDI)により脱塩し、凍結乾燥した。このようにして約1kgの粗製酵母多糖を回収した。得られた酵母多糖は褐色粉末で、水には完全には溶解しなかった。糖含量は約70%、蛋白質含量は約12%、糖組成はガラ\*

\*クトース：グルコース：マンノースがおおよそ1.4：

1：4であった。このようにして得られた酵母多糖を、グアファイバーと同様の方法で酸分解することによりB×20の酵母多糖分解物を得た。

【0025】ブロイラー用試験飼料 (幼雛用、日本配合飼料(株)製) にマンノースを0.3%添加した飼料を餌付けより摂取させた4日齢ブロイラー群5羽、グアファイバー分解物を4.3%(v/v)または酵母多糖分解物を5.0%(v/v)添加した飲水で飼育した4日齢ブロイラー各群5羽に、鶏病原性大腸菌の $6 \times 10^7$ /ml 滅菌生理食塩水懸濁液を1ml/羽ずつその嚢内に強制経口投与した。また大腸菌投与後7日目に直腸内容物を採取し、大腸菌数を測定した。結果を表4に示す。

【0026】

【表4】

鶏病原性大腸菌感染試験 (直腸内容物)

試験群	log(bacteria/g)
対照群	7.2
マンノース投与群	5.6*
グアファイバー分解物投与群	6.6*
酵母多糖分解物投与群	5.8*

\*t 検定で有意差あり ( $p < 0.05$ )

【0027】ブロイラー用試験飼料 (幼雛用、日本配合飼料(株)製) にメチル- $\alpha$ -マンノシド( $\alpha$ MM)を5.0%またはガングリオシド(Gg)を0.1%添加した飼料を餌付けより摂取させたブロイラー各群5羽に、1、2日齢時に鶏病原性大腸菌の $6 \times 10^7$ /ml 滅菌生理食塩水懸濁液を1ml/羽ずつその嚢内に強制経\*

※口投与した。また、6日齢時に新鮮糞便を採取し、大腸菌数を測定した。なおGgは、シグマ社製のTypeIIgangliosidesとTypeIIIfangliosidesを3：2で混合したものを用いた。結果を表5に示す。

【0028】

【表5】

鶏病原性大腸菌感染試験 (糞便)

試験群	log(bacteria/g)
対照群	8.1
$\alpha$ MM投与群	6.8*
Gg投与群	7.2*

\*t 検定で有意差あり ( $p < 0.05$ )

表4および表5より明らかなように、マンノース、グアファイバー分解物、酵母多糖分解物、 $\alpha$ MM、Ggにより、鶏腸内での大腸菌の定着・増殖が抑制されていることがわかる。

【0029】実施例4 (カンピロバクター・ジェジュニ感染試験)

ブロイラー用試験飼料 (幼雛用、日本配合飼料(株)製) にマンノースまたはグアファイバーまたは酵母多糖を0.3%添加した飼料を餌付けより摂取させた4日齢ブロイラー各群5羽、グアファイバー分解物を4.3%(v/v)または酵母多糖分解物を5.0%(v/v)添加した飲水で飼育した4日齢ブロイラー各群5羽に、

カンピロバクター・ジェジュニの $1.7 \times 10^6$ /ml 滅菌生理食塩水懸濁液を1ml/羽ずつその嚢内に強制経口投与した。カンピロバクター・ジェジュニ投与直前および投与後1日目に給排泄腔より糞便をスワブで採取し、カンピロバクター・ジェジュニを検出した。結果を表6に示す。表6から明らかなように、予めマンノース類を摂取させると、カンピロバクター・ジェジュニ投与直後から、鶏腸内での定着・増殖が抑制されることがわかる。

【0030】

【表6】

## キャンピロバクター・ジェジュニ感染試験

## 感染後日数

試験群	0	1
対照群	0/5	5/5
マンノース投与群	0/5	3/5
グアファイバー分解物投与群	0/5	0/5
グアファイバー投与群	0/5	2/5
酵母多糖分解物投与群	0/5	1/5
酵母多糖投与群	0/5	1/5

検出検体数/検査検体数、検出限界  $10^2$ /スワブ

【0031】

【発明の効果】本発明の飼料を用いることにより、家畜・家禽の有害細菌の腸管への付着を阻害することにより感染を予防することができ、家畜・家禽の健康維持・改善や生産性の向上に有効である。さらに、該畜産物を食した\*

\*ときに発生する恐れのある食中毒を回避することができ。また、有効成分であるマンノース類、シアル酸類、ラクト-N-フコペンタオースは、天然に存在する物質であるから、安全で無害である。

---

フロントページの続き

(72)発明者 岡田 忠昭

神奈川県横浜市港北区師岡町760番地 明治製菓株式会社薬品総合研究所内

(72)発明者 平山 匡男

埼玉県坂戸市千代田5丁目3番1号 明治製菓株式会社生物科学研究所内



## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **08038064 A**(43) Date of publication of application: **13.02.96**

(51) Int. Cl.

**A23K 1/16****A23K 1/16****A23K 1/00**(21) Application number: **06192717**(22) Date of filing: **26.07.94**(71) Applicant: **MEIJI SEIKA KAISHA LTD**

(72) Inventor:

**NAKAMURA HIROBUMI**  
**SHIMIZU HIROKO**  
**SHIMIZU NORIO**  
**OKADA TADAAKI**  
**HIRAYAMA MASAO**

**(54) FEED CAPABLE OF PREVENTING INFECTION OF HARMFUL BACTERIUM**

(57) Abstract:

**PURPOSE:** To obtain a feed capable of preventing livestock or poultry from being infected with harmful bacteria through inhibiting adherence of such bacteria to come via the enteric canal to the intestine, thus effective for maintaining or improving the health of livestock/poultry, by formulating the original feed with specific harmful bacteria infection-preventive ingredient(s).

**CONSTITUTION:** This feed is obtained by formulating the original feed with, as harmful bacteria infection-preventive ingredient(s), pref. 0.1-1wt.% of at least one kind selected

from mannoses (pref. mannose or methyl- $\alpha$ -mannoside), sialic acids (pref. N-acetylneuraminic acid or ganglioside) and lactol-N- fucopentaose. It is preferable that this feed begin to administer at the time of fledging or juvenile livestock stage having small number of harmful enterobacteria.

COPYRIGHT: (C)1996,JPO